

云南宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 转染 HLA-A*0201 的抗肿瘤研究

邵文萍¹⁾, 罗劭蕾²⁾, 郝萍¹⁾, 马丽菊¹⁾, 唐睿株¹⁾, 闫凤彩¹⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院临床医学实验研究科, 云南昆明 650032; 2) 云南大学医学院, 云南昆明 650091)

[摘要] **目的** 在云南宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 中转染并表达外源性云南肺癌患者白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 等位基因高频位点 HLA-A*0201 基因, 以诱导肿瘤抗原特异性的细胞毒作用. **方法** 采用序列特异性引物扩增 (PCR-SSP) 法对 XWLC-05 细胞行 HLA-DNA 分型, 脂质体转染法将真核质粒 pcDNA3.1-HLA-A*0201 导入 XWLC-05 细胞并用 G418 筛选阳性克隆, 淋巴细胞分离液提取健康人外周血单个核细胞 (PBMCs) 诱导培养为 LAK 细胞, 免疫磁珠分选法提取出 CD8⁺T 淋巴细胞 (CTLs), MTT 法测试肿瘤特异性的细胞毒效应. **结果** 筛选出稳定表达 HLA-A*0201 基因的阳性克隆, 免疫激活并分选出 HLA-A*0201 阳性的 CTLs, 该细胞对转染了 HLA-A*0201 基因的肿瘤细胞有更强的杀伤活性. **结论** HLA-A*0201 基因低表达或缺失, 在导致肿瘤细胞免疫逃逸方面起重要作用, HLA-A*0201 基因可诱导出 HLA-A*0201 限制的肿瘤特异性 T 淋巴细胞杀伤效应.

[关键词] HLA-A*0201; 基因转染; 肿瘤细胞; LAK 细胞

[中图分类号] R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0010-05

The Role of HLA-A*0201 in Tumor Treatment by Transfected into Xuanwei Lung Adenocarcinoma Cell Line XWLC-05

SHAO Wen-ping¹⁾, LUO Shao-lei²⁾, HAO Ping¹⁾, MA Li-ju¹⁾, TANG Rui-zhu¹⁾, YAN Feng-cai¹⁾

(1) *Clinical Medicine Experiment Research Center, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032;* 2) *School of Medicine, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China*)

[Abstract] **Objective** HLA-A*0201 was transfected and expressed in Yunnan Xuanwei lung cancer cell line XWLC-05 in order to induce the tumor antigen-specific cytotoxicity. **Methods** XWLC-05 cells were HLA-DNA typed using sequence-specific primers PCR (PCR-SSP), and the cells were transfected with eukaryotic expressing plasmid pcDNA3.1-HLA-A*0201 or the control vector by liposome transfection. Positive clones were screened with G418. Healthy human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were extracted using lymphocyte separation medium, and them were activated or become LAK cells with PHA or rhIL-2, respectively. The CD8⁺ T lymphocytes (CTLs) were extracted from them by immunomagnetic beads, respectively. MTT was used to assay the effects of tumor-specific cytotoxicity. **Results** The positive clones stably expressing HLA-A*0201 were gotten, the CTLs expressing HLA-A*0201 were activated and sorted from PBMCs of healthy human, and these CTLs showed powerful ability to kill the cancer cells transfected with HLA-A*0201. **Conclusion** Deletion or weak expression HLA-A*0201 likely plays an important role in tumor cells escaping from host immune defenses, and HLA-A*0201-restricted tumor-specific T lymphocyte killing effect could be induced by HLA-A*0201.

[Key words] HLA-A * 0201; Gene transfection; Tumor cells; LAK cells

肺癌的发病率在全球均呈快速上升趋势, 其恶性程度高, 发现晚, 治疗困难. 除了环境因素的影响外, 遗传易感性在肺癌的发病中起着不可忽视的作用. 围绕着人组织相容性复合物 (major

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160276); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB82)

[作者简介] 邵文萍 (1965~), 女, 云南石屏县人, 大专, 主管技师, 主要从事肿瘤遗传学工作.

[通讯作者] 郝萍. E-mail: hping92@hotmail.com

histocompatibility complex, MHC) 基因与云南高发肺癌发病的相关性, 本课题组进行了一系列研究, 对云南肺癌患者进行人白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因多态性分析后, 发现 HLA-A*02、B*46 出现的频率明显高于对照组; 对 HLA-A*02 基因进行亚型分析, 检出 HLA-A*0201、0203、0206、0207 四种等位基因亚型, 其中以 0207 和 0201 高频出现^[1,2]. 为进一步了解该基因在肿瘤特异性免疫杀伤中的功能, 本研究选择 HLA-A*0201 这一肺癌相关的高频位点进行了初步探索, 取得了积极的结果, 现报道如下.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 实验用肿瘤细胞株为云南宣威肺腺癌细胞 XWLC-05 (本实验室保存), 质粒 pcDNA3.1-HLA-A*0201 为美国 SUNOL 生物公司 Zhu Xiaoyun 博士惠赠, HLA-A*0201 阳性的健康人外周血.

1.1.2 主要试剂 HLA ABDRDQ UNITRAY 试剂盒 (美国 PEL-FREEZ 公司), 全血基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司), Promega Taq 酶及 DNA Marker-DL2000 (宝生物), MIDIPREP System (中提) 质粒 DNA 抽提试剂盒 (GBICO 公司), Bst XI 限制性内切酶、Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂 (Invitrogen 公司), anti-HLA-A2-FITC 及同型对照 (BD Biosciences 公司).

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 肺癌细胞株 XWLC-05 的培养 采用 10% FBS/RPMI 1640 培养基 (含 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素), 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的温箱中培养.

1.2.2 XWLC-05 细胞的 HLA 基因分型 收集对数生长期 XWLC-05 细胞, 用人全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 用 HLA ABDRDQ UNITRAY 试剂盒采用 PCR-SSP 法进行 XWLC-05 细胞 HLA 等位基因扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳

分析结果. 实验操作方法、PCR 反应体系、扩增参数及结果判读均以试剂盒说明书为准.

1.2.3 pcDNA3.1-HLA-A*0201 质粒 DNA 的扩增及提取 将带有 HLA-A*0201 目的基因的质粒转化于大肠杆菌 DH5α, LB 培养基培养扩增细菌, 质粒 DNA 抽提试剂盒 MIDIPREP System (中提) 提取质粒 DNA, Bst XI 限制性内切酶对抽提的质粒 DNA 鉴定.

1.2.4 XWLC-05 细胞的 HLA-A*0201 基因转染 采用脂质体转染法, 质粒与脂质体比例为 4.0 μg DNA: 10 μL, 操作步骤按照试剂说明书进行.

1.2.5 转染阳性 XWLC-05 细胞的筛选 采用浓度为 1 mg/mL 的 G418 进行阳性克隆筛选.

1.2.6 转染阳性 XWLC-05 细胞的鉴定 分别采用免疫荧光法、流式细胞术、HLA 等位基因分型法进行. 操作步骤均按常规方法进行. 简言之, 免疫荧光法系将 XWLC-05 细胞与抗 HLA-A2-FITC 抗体 4℃避光孵育 30 min, PBS 洗涤后荧光显微镜下观察结果. 流式细胞术系将细胞与抗 HLA-A2-FITC 抗体 4℃避光孵育 30 min, PBS 洗涤后流式细胞仪分析结果. HLA 等位基因分型方法同前. 未转染 XWLC-05 细胞设为阴性对照.

1.2.7 LAK 细胞的培养 LAK 细胞即淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphokine activated killer cells, LAK). 将从 HLA-A2 表达阳性的健康人外周血分离的单个核细胞 (PBMNCs) 用补加植物血凝素 PHA 60 μg/mL 及 rhIL-2 500 U/mL 的 10% FBS/RPMI1640 培养基 (含 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 于 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱内培养. 设不加细胞因子培养的 PBMNCs 组作对照.

1.2.8 CD8⁺T 淋巴细胞 (CTLs) 的免疫分选 用生物免疫磁珠法分别从培养 1 周后的 LAK 细胞和 PBMNCs 中分离提取 CTLs.

1.2.9 CTLs 对 XWLC-05 细胞的体外杀伤效应 分别将效应细胞 CTLs 与未转染和转染 HLA-A2 基因的 XWLC-05 细胞以不同的效靶比 (32:1、16:1、8:1、4:1) 共培养, 用 MTT 法检测效应细胞的体外杀伤活性.

$$\text{杀伤活性} = \frac{(\text{实验组 OA 值} - \text{效应细胞组 OA 值})}{\text{靶细胞组 OA 值}} \times 100\%$$

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件包处理, 用 *t* 检验方

法比较体外杀伤效应数据, *P* < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 pcDNA3.1-HLA-A*0201 质粒 DNA 的鉴定

采用 Bst XI 限制性内切酶对提取的质粒 DNA 进行双酶切鉴定, 结果显示该质粒成功装载有目的基因 HLA-A*0201 (图 1) .

2.2 基因转染阳性 XWLC-05 细胞的免疫荧光鉴定

荧光显微镜下可见转染阳性的细胞膜发出明亮的绿色荧光 (外源基因表达于细胞膜上), 图 2.

2.3 基因转染阳性 XWLC-05 细胞的流式细胞术鉴定

分析结果显示, 转染阳性细胞可见 HLA-A2 蛋白分子的表达 (图 3) .

2.4 基因转染阳性 XWLC-05 细胞的 HLA 等位基因分型鉴定

经 PCR-SSP 检测, 转染阳性细胞 DNA 可见 HLA-A*0201 基因的表达 (于 Lane 32 箭头示, 图 4、图 5) .

2.5 CTLs 对 XWLC-05 细胞的体外杀伤效应检测

数据显示 (表 1、表 2), LAK 和 PBMCs 2 种细胞对 HLA-A*0201 基因转染阳性 XWLC-05 细胞的杀伤活性在不同靶靶比下都明显高于未转染 XWLC-05 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明转染有 HLA-A*0201 基因的 XWLC-05 可被 CTLs 有效识别并发挥杀伤作用. 而且, LAK 组无论是对未转染 XWLC-05 还是 HLA-A*0201 基因转染阳性 XWLC-05 的杀伤活性都明显高于 PBMCs 组, 说明经过 IL-2 诱导的 CTLs 较未经诱导的 CTLs 对靶细胞有更好的杀伤活性.

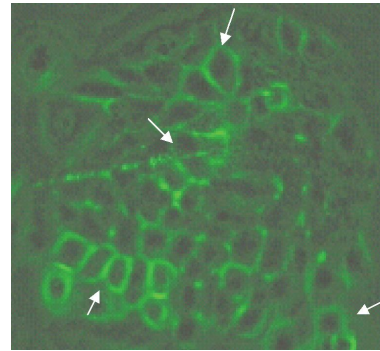


图 2 荧光显微镜下转染阳性的细胞膜呈现明亮的绿色荧光 (箭头示)

Fig. 2 Immunofluorescence of XWLC-05 transfected with HLA-A*0201

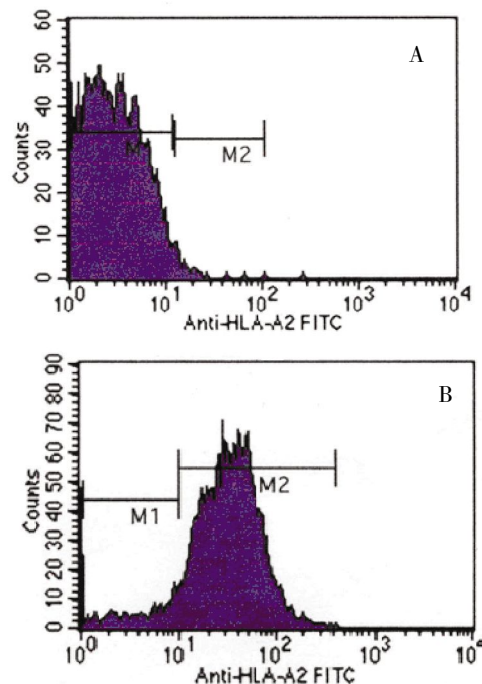


图 3 流式细胞术分析示转染阳性细胞可见 HLA-A2 蛋白分子的表达

Fig. 3 The expression of HLA-A2 protein in XWLC-05 transfected with HLA-A*0201 analyzed by flow cytometry

A:左图为未转染细胞; B:右图为转染阳性细胞.

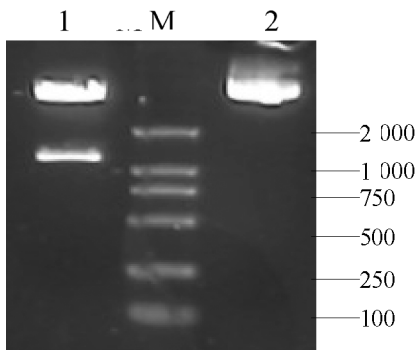


图 1 质粒 pcDNA3.1-HLA-A*0201 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of plasmid pcDNA3.1-HLA-A*0201

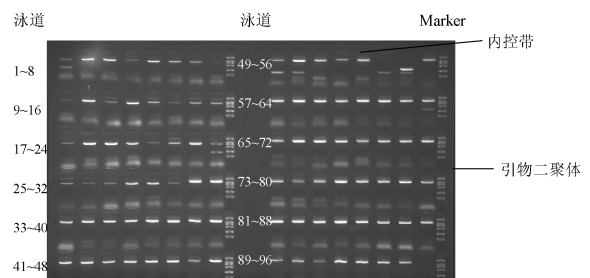


图 4 未转染 XWLC-05 细胞 HLA 等位基因分型, 未见 HLA-A*0201 表达 (于 Lane 32 处无扩增条带)

Fig. 4 The HLA-typed alleles of XWLC-05 cells (no expression of HLA-A*0201)

Lane1~30 为 HLA-DRB1*、DRB3*、DRB4*、DRB5* 和 DQB1* 等位基因区; Lane 31~53 为 A* 等位基因区, 其中 32 为 HLA-A*0201(-); Lane 54~95 为 B* 等位基因区; Lane 96 为污染控制道.

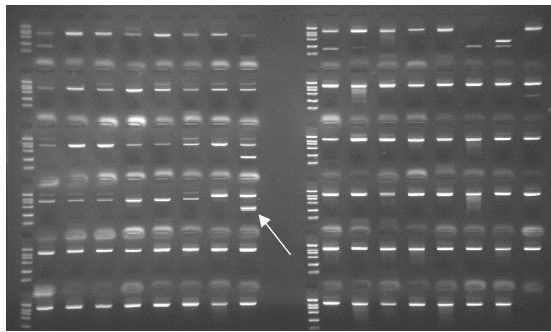


图5 基因转染阳性 XWLC-05 细胞 HLA 等位基因分型 (箭头所指为 HLA-A*0201 特异性条带)

Fig. 5 The HLA-typed alleles of XWLC-05 cells transfected with HLA-A*0201 (showed the expression of HLA-A*0201)

表1 PBMCs 组效应细胞对靶细胞 XWLC-05 的杀伤活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The cytotoxicity of CTLs in PBMCs against XWLC-05 ($\bar{x} \pm s$)

效靶比	n	PBMCs 组		P
		未转染 XWLC-05	转染 XWLC-05	
32:1	4	10.79 ± 0.48	17.76 ± 0.85	0.000
16:1	4	8.71 ± 0.32	15.46 ± 0.52	0.000
8:1	4	8.25 ± 0.30	10.64 ± 0.39	0.000
4:1	4	4.62 ± 0.36	6.88 ± 0.34	0.003

表2 MTT 法测定的 LAK 组效应细胞体外杀伤活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The cytotoxicity of CTLs in LAK against XWLC-05 ($\bar{x} \pm s$)

效靶比	n	LAK 组		P
		未转染 XWLC-05	转染 XWLC-05	
32:1	4	25.68 ± 0.95	36.93 ± 0.65	0.000
16:1	4	16.83 ± 0.82	20.36 ± 0.62	0.000
8:1	4	13.70 ± 0.31	18.33 ± 0.78	0.000
4:1	4	8.82 ± 0.26	10.79 ± 0.47	0.002

3 讨论

肺癌是目前世界上发病率和死亡率均位居第一的恶性肿瘤, 在中国亦不例外。全国肿瘤登记中心发布的数据显示, 全国肿瘤登记地区 2010 年新发病例数 309 万, 其中肺癌占 60 万, 发病率为 46.08/10 万, 占 19.59%; 而肿瘤死亡数 195 万, 肺癌死亡率 37/10 万, 占 24.87%。在所有地区, 肺癌是最常见的恶性肿瘤, 也是致死的首要原因;

在女性, 乳腺癌发病率居首, 而肺癌即紧随其后, 死亡原因却是肺癌第一^[3]。云南省个旧、宣威、富源地区肺癌呈点状高发, 尽管已做了不少工作, 但仍缺乏有效的控制手段。肺癌防治形势异常严峻, 由此可见一斑。

机体免疫功能的异常与肿瘤的免疫逃逸机制在肿瘤的发生发展中起重要作用。由 HLA-I 类抗原限制的 CTLs (CD8⁺T 淋巴细胞) 是主要的抗肿瘤效应细胞, 它们活化后可以直 接杀伤肿瘤细胞, 和 / 或通过分泌多种细胞因子而发挥抗瘤作用。正常情况下, HLA-I 类分子表达于机体所有有核细胞表面, 在抗原呈递及 CTLs 识别抗原的过程中起关键作用; 内源性肿瘤细胞抗原肽被 HLA-I 类分子递呈于肿瘤细胞表面, 是机体 T 淋巴细胞识别、杀伤肿瘤细胞的分子基础。而肿瘤细胞表面 HLA-I 类分子低表达或缺失, 干扰 CD8⁺CTLs 的激活和识别是肿瘤细胞逃避机体免疫监视而发生发展的主要机制之一。如果细胞表面的 HLA-I 类分子表达异常, 就可能发生这些异常的细胞逃避机体的免疫监视而继续增殖, 进而危害健康。有证据显示, 在 I 期 NSCLC 病人切除的肺癌组织中, HLA-I 类分子低表达或缺失者达 64%^[4], 在手术切除的 65 例原发性肺癌组织中有 56 例和所有 31 例转移淋巴结均有 HLA-I 类抗原的表达下调^[5], 更有甚者, 还发现在切除的 NSCLC 组织中不仅 HLA-I 类分子低表达或缺失 68.9%, 且其中的 CTLs 的数量明显低于 HLA-I 分子正常者^[6]。本课题组前期工作发现, 云南肺癌患者 HLA-A*02、B*46 出现频率明显高于对照组, 对 HLA-A*02 基因进行亚型分析, 检出 HLA-A*0201、0203、0206、0207 4 种等位基因亚型, 其中以 0207 和 0201 高频出现^[1,2], 与文献报道中国北方汉族人群肺癌 HLA-A*0201 高频出现相吻合^[7]。针对 HLA-A*0201 限制的抗原肽在肿瘤的免疫杀伤实验取得了令人鼓舞的结果, 有报道示, 睾丸癌抗原 MAGE-A3 广泛表达于上皮恶性疾病中, 但不表达于大多数正常组织, 为刺激机体产生高活性的抗该抗原的 TCRs, 研究者利用 HLA-A*0201 限制的来自 MAGE-A3 的 2 个肽段免疫转人 HLA-A*0201 基因的小鼠, 获得特异的 T 细胞克隆, 将针对这 2 个肽段的 TCR 表达于人外周血细胞展现出了抗一系列黑色素瘤和非黑色素瘤细胞的抗原特异的免疫应答, 而且能够提高 CD4 和 CD8 细胞的免疫活性^[8]; 一项 II 期临床试验显示, 给 46 例 HLA-A*0201 阳性的治疗失败的晚期 NSCLC 患者接种 hTERT 来源的 2 个肽段进行序贯

免疫,结果显示,全程接种后产生免疫反应的病人比那些免疫失败的病人获得较高的无进展生存期(PFS),且总生存期(OS)亦较无反应者显著延长(40.2月对9.2月),极大地提高临床转归^[9]。本研究将HLA-A*0201基因导入不表达该基因的XWLC-05细胞,再将该细胞与经细胞因子刺激的携带HLA-A*0201基因健康人的外周血CTLs共孵育,产生较好的免疫杀伤效果,初步印证了前述的研究结果。

所以,针对NSCLC组织中HLA-A*0201基因的低表达和缺失现象,可以采取将该基因导入肿瘤组织,增强肿瘤细胞HLA-I类抗原的表达,提高免疫系统识别肿瘤细胞的能力,诱导出特异性免疫杀伤效应,发挥良好的抗肿瘤效果,进而实现肿瘤个体化治疗。

[参考文献]

- [1] 唐睿珠,雷雨,李继梅,等. HLA-A*02等位基因与云南宣威肺癌相关性研究[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(7):624-626.
- [2] 王红明,刘铮,李继梅,等. 云南肺癌患者HLA-A,B基因多态性分析[J]. 昆明医学院学报,2010,31(2):8-11.
- [3] CHEN W,ZHENG R,ZHANG S,et al. Annualreport on status of cancer in China, 2010 [J]. Chin J Cancer Res, 2014,26(1):48-58.
- [4] HANAGIRI T,SHIGEMATSU Y,SHINOHARA S,et al. Clinical significance of expression of cancer/testis antigen and down-regulation of HLA class-I in patients with stage I non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2013,33(5):2123-2128.
- [5] HE X P, SONG F J, LIU X Y, et al. The relationship between KRAS gene mutations and HLA class I antigen down regulation in the metastasis of non-small cell lung cancer [J]. J Int Med Res,2013,41(5):1473-1483.
- [6] KIKUCHI E, YAMAZAKI K, TORIGOE T, et al. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer [J]. Cancer Sci, 2007,98(9):1424-1430.
- [7] YANG L, WANG L J, SHI G L, et al. Analysis of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles in Chinese patients with lung cancer[J]. Genet Mol Res,2010,9(2):750-755.
- [8] CHINNASAMY N, WARGO J A, YU Z, et al. A TCR targeting the HLA-A*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer [J]. J Immunol, 2011,186(2):685-696.
- [9] KOTSAKIS A, PAPANIMITAKI E, VETSIKA E K, et al. A phase II trial evaluating the clinical and immunologic response of HLA-A2+ non-small cell lung cancer patients vaccinated with an hTERT cryptic peptide[J]. Lung Cancer, 2014,86(1):59-66.

(2015-01-19 收稿)